

(19) 대한민국 특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.7
 C12N 5/08

(11) 공개번호
 (43) 공개일자

특2003- 0069115
 2003년08월25일

(21) 출원번호
 (22) 출원일자

10- 2003- 0010269
 2003년02월19일

(30) 우선권주장 1020020008639 2002년02월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
 메디포스트(주)
 경기도 용인시 수지읍 성복리 39- 3

(72) 발명자
 양윤선
 서울특별시 송파구 잠실7동 우성아파트20- 202

양성은
 경기도 성남시 분당구 금곡동 180 청솔마을 유천화인아파트 204동 1104호

하철원
 서울특별시 강남구 압구정동 미성아파트 1동 306호

(74) 대리인
 박승문
 조용식
 안소영

실사청구 : 있음

(54) 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포의 분리배양방법 및 간엽조직으로의 분화유도방법

요약

본 발명은 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포의 분리배양방법 및 간엽조직으로의 분화유도방법에 관한 것이다.

본 발명의 세포 분리배양방법에서는 제대혈을 피콜- 하이팩 용액에 중첩시킨 후, 원심분리하여 단핵세포층 침전을 얻고, 상기 단핵세포를 단층배양하여 얻은 세포들을 간업줄기세포 · 전구세포 등이 항원에 대한 항체와 일정시간 반응시키고, 세포분리기를 이용하여 해당 항체와 결합한 세포들만을 분리하여 배양함으로써, 높은 순도와 우수한 성준도를 지닌 간업줄기세포 · 전구세포를 얻는다.

본 발명의 간업줄기세포 · 전구세포는 적절한 분화 베지 및 조건 하에서 언글세포 또는 골세포 등의 다양한 간엽조직으로 분화할 수 있는 능력을 지닌다.

따라서, 본 발명의 세포 분리배양방법을 통해 간업줄기세포 · 전구세포를 대량생산 할 수 있으며, 그 결과 얻어진 세포들은 손상된 간엽조직의 재생 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 2

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 제대장액에서 채취된 제대혈을 담은 채취백을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 형태학적 특징을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 조혈관관련항원 및 조직적합항원의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 내피세포 관련항원 및 파골세포 관련항원의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 인테그린 수용체 관련항원의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 매트릭스 수용체 관련항원의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 기타 항원의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포에서 간업줄기세포·전구세포의 표면항원들이 발현되는지 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 연골분화배양 후 연골조직 관련 단백질에 대한 면역염색 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 연골분화배양 후 연골조직 관련 유전자에 대한 RT- PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 골분화배양 후 골조직 관련 단백질 및 무기질에 대한 조직화학염색 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 골분화배양 후 골조직 관련 유전자에 대한 RT- PCR 결과를 나타낸 도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포의 분리배양방법 및 간업조직으로의 분화유도방법에 관한 것이다.

만성질환이나 암 등으로 인해 손상된 조직과 장기를 치료하는 기술은 약물요법 등의 내과적 치료와, 수술 등의 외과적 치료가 주류를 이루고 있다. 그러나, 이는 중상만을 완화시키는 대증적 치료에 그치는 경우가 많고, 수술 후 합병증이 많이 일어나며, 장기간 치료시 경제적 부담이 크다는 등의 문제점이 있다.

최근에는 기존의 문제점을 해결하고 더욱 우수한 치료효과를 기대할 수 있는 조직 및 장기의 치료 기술의 한 방편으로, 자가복제(self-renewal) 및 분화(differentiation)가 가능한 세포를 재생이 필요한 조직 및 장기에 주입하는 방법이 주목받고 있다.

이러한 세포의 대표적인 예로 간업줄기세포·전구세포와 조혈모세포를 들 수 있다. 그 중 조혈모세포는 적혈구, 백혈구, 혈소판 등 혈관 내외의 혈관세포로 분화되는 반면, 간업줄기세포·전구세포는 보다 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 다능성의(multipotent) 줄기세포이다.

간엽줄기세포·전구세포는 골수의 간질세포를 비롯하여 연골, 골, 지방조직, 근육, 간, 인대 및 신경조직 등 인체를 구성하는 각종 세포와 조직으로 분화할 수 있으므로, 재생의학의 실용화 측면에서 가장 핵심적인 세포로 각광받고 있다.

현재 간엽줄기세포·전구세포를 얻을 수 있는 대표적 기원 조직은 골수(bone marrow)를 들 수 있다.

골수에는 간엽줄기세포·전구세포가 풍부하지만, 골수 세취는 여러 번 수술침으로 찌르는 등 간접적인(invasive) 기술이므로 실용화하기 어렵고, 시술할 경우 전신마취를 필요로 하므로 환자에게 정신적·육체적으로 큰 부담이 되며, 시술시 겪게 되는 고통 또한 크다. 이러한 체취과정의 어려움으로 인해, 골수보관은행 등의 인프라 구축은 비현실적이고 불가능한 실정이다.

반면 제대혈의 체취는 아기의 출산 후 간단하게 시행할 수 있으며, 산모와 아기에게 전혀 해가 없어 실용화 가능성이 높다. 또한 제대혈은 골수에 비해 보관 산업이 활성화되어 있으므로, 공여자(donor)를 구하는 것도 용이하다.

제대혈은 조혈모세포의 좋은 기원조직으로서, 제대혈을 이용한 조혈모세포이식은 임상적으로 활성화되어 있다. 그러나 제대혈이 간엽줄기세포·전구세포의 좋은 기원조직이 될 수 있는지에 대해서는 아직 제대로 알려져 있지 않으므로, 본 발명에서는 제대혈로부터 간엽줄기세포·전구세포를 분리, 배양하는 기술 및 그 성상을 규명하고자 한다.

제대혈에서 간엽줄기세포·전구세포를 얻고자 할 때 고려해야 할 사항은, 제대혈 내에는 혈구들을 비롯한 다양한 종류의 세포들이 존재하며, 그 중 간엽줄기세포·전구세포는 극히 일부분에 지나지 않기 때문에 간엽줄기세포·전구세포만을 높은 순도(purity)와 우수한 생존도(viability)를 유지하면서 분리배양할 수 있는 기술이 요구된다.

현재 간엽줄기세포·전구세포의 분리배양기술은 피콜 하이魄(Ficoll- Hypaque) 용액을 이용한 원심분리기술이 주류를 이루고 있다. 그러나 이 방법은 제대혈 내에 존재하는 다양한 종류의 세포 중 백혈구만을 제거할 수 있을 뿐이므로, 분리된 세포 중에 실제 이용 가능한 간엽줄기세포·전구세포의 수가 매우 적으며, 계대배양 중에도 다른 세포들의 영향을 받아 생존도 또한 낮다는 문제점이 있다.

이처럼 세포의 수적, 질적 저하로 인해 간엽조직으로의 분화유도가 제대로 이루어질 수 없으며, 특정 조직으로 분화시키기 위한 조건 또한 정립되어 있지 않은 실정이다.

따라서, 효율적인 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 분리배양방법 및 상기 세포들을 간엽조직으로 분화시키는 방법에 대한 발명이 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서는 간엽줄기세포·전구세포 특이 항체를 이용한 항원-항체 반응을 통해, 제대혈로부터 간엽줄기세포·전구세포를 효율적으로 분리배양하는 방법과 상기 세포들을 간엽조직으로 분화유도하는 방법을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 제대혈로부터 간엽줄기세포·전구세포를 분리배양하는 방법을 제공한다.

본 발명의 세포 분리배양방법은 제대혈을 피콜- 하이魄 용액에 증첩시킨 후, 원심분리하여 단핵세포층(mononuclear cells layer) 침전을 얻고, 상기 단핵세포를 단층배양하여 얻은 세포들을 간엽줄기세포·전구세포 특이 항원에 대한 항체와 일정시간 반응시키고, 세포분리기를 이용하여 해당 항체와 결합한 세포들만을 분리하여 배양함을 특징으로 한다.

본 발명의 세포 분리배양방법에서, 세포성분의 기원 조직인 제대혈은 포유동물에서 태반과 터아를 연결하는 제대장액으로부터 체취된 혈액으로 정의된다. 본 발명의 세포 분리배양방법에서는 인간의 제대혈을 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 세포 분리배양방법에서 사용하는 피콜- 하이魄 용액은 밀도 1.077g/ml인 것이 바람직하다.

본 발명의 세포 분리배양방법에서, 간엽줄기세포·전구세포 특이 항원에 대한 항체는 간엽줄기세포·전구세포에서 발현되는 세포표면항원에 대한 항체 중 선 택된 하나 이상을 사용한다. 구체적으로는 CD105, stro-1, SH3 및 SH4에 대한 항체 중 선택된 하나 이상을 사용하며, 순도를 최대한 높이기 위해서는 이들 항체 모두를 동시에 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 세포 분리배양방법에서 사용하는 간업줄기세포·전구세포 특이 항원에 대한 항체는 세포분리기의 특성에 따라 적절한 표식 물질을 부착하여 사용한다. 구체적으로, 마그네틱 세포 분리기(magnetic cell sorter)를 사용할 때는 마그네틱 미세비드(magnetic microbead)가 부착된 항체를 사용하며, FACsorter를 사용할 때는 FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), PerCP 등의 형광물질이 부착된 항체를 사용한다.

이렇게 하여 분리된 세포 중에는 상기 항원들을 발현하는 세포, 즉 간업줄기세포·전구세포만이 존재하게 된다.

이와 같이 본 발명에서는 간업줄기세포·전구세포 특이 항체를 이용하여 항원-항체 간의 양성 반응을 유도함으로써, 제대혈에 존재하는 다양한 종류의 세포 중에서 간업줄기세포·전구세포만을 높은 순도로 분리한 후 배양하기 때문에, 이용 가능한 줄기세포의 실질적인 수를 증가시킨다.

본 발명은 상기 세포 분리배양방법에 의해 얻어진 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포를 제공한다.

본 발명에서 전구 세포는 제대혈 간업줄기세포로부터 유래하는 세포 중에서, 제대혈 간업줄기세포가 언골세포 또는 골세포로 분화되는 과정 중 얻어질 수 있는 모든 전구세포들과 연골세포(chondrocyte) 및 골모세포(osteoblast) 등을 모두 포함하는 개념이다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 면역표현형(immunophenotyping)적 특성이 있어서, CD29, CD49e, CD44, CD54, CD13, CD90, SH2, SH3, SH4에 대한 항체에 대해 양성 반응을 나타내며, CD45, CD34, CD14, HLA-DR, CD31, CD51/61, CD49d, CD106, CD64에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타낸다. 특징으로 한다.

이하, 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포가 지난 상기 면역표현형적 특성의 의의를 상세히 설명한다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 조혈관련항원인 CD45, CD34, CD14, 그리고 조직적합항원인 HLA-DR에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타낸다.

이처럼 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 조혈관련항원과 조직적합항원이 결여되어 있으므로, 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 조직 또는 장기 이식의 가장 큰 문제점인 거부반응을 최소화할 수 있다. 따라서, 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 동종간 이식(allogeneic transplantation)의 세포 소스이다. 보편적인 공여자 세포로서 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 내피세포(endothelial cell) 관련항원인 CD31, 그리고 파골세포(osteoclast) 관련항원인 CD51/61에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타낸다.

따라서, 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포를 조직 이식에 사용할 경우, 불필요하게 혈관을 생성하거나, 또는 연골이나 골 생성과정 중 파골세포로 분화함으로써 야기될 수 있는 부작용이 최소화된다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 인테그린 수용체(integrin receptor) 관련항원인 CD29 및 CD49e에 대한 항체에 대해 양성 반응을, CD49d에 대한 항체에 대해서는 음성 반응을 나타낸다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 매트릭스 수용체(matrix receptor) 관련항원인 CD44, CD54에 대한 항체에 대해 양성 반응을, CD106에 대한 항체에 대해서는 음성 반응을 나타낸다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 기타 항원들, 즉 CD13, CD90에 대한 항체에 대해 양성 반응을, 그리고 CD64에 대한 항체에 대해서는 음성 반응을 나타낸다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 간업줄기세포·전구세포 관련 항원인 SH2, SH3, SH4에 대한 항체에 대해 양성 반응을 나타내며, 이러한 면역표현형은 여러 세대가 지난 후에도 안정적으로 유지된다.

상기와 같은 본 발명의 세포의 면역표현형은 전형적인 간업줄기세포·전구세포의 면역표현형과 일치하는 것이다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포는 자가복제하는 능력이 있으므로, 특정한 세포나 조직으로 분화되지 않으면서 적절한 조건 하에서 계속적인 증식이 가능하다.

본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포·전구세포는 골수, 근육, 피부 등의 일반간엽조직으로부터 분리된 간업줄기세포에서 유래한 세포들에 비해, 더욱 어린 개체로부터 기원한 세포이므로 세포의 증식 및 분화 능력이 훨씬 우수하다. 이러한 다능성에 의해, 본 발명의 세포는 적절한 분화 조건 하에서 뼈, 연골, 지방조직, 근육, 건 등과 같은 간엽 조직으로 분화될 수 있다.

구체적으로 본 발명에서는 상기 제대혈 유래 간엽줄기세포 · 전구세포를 간엽조직세포로 분화시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 세포분화방법은 분화시키기 원하는 간엽조직세포의 종류에 따라, 적절한 세포분화용 배지에서 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포 · 전구세포를 일정시간 및 조건 하에 배양함을 특징으로 한다.

본 발명의 세포분화방법에서, 분화시키고자 하는 간엽조직세포는 구체적으로 언골세포 또는 골세포가 될 수 있으며, 본 발명에서 사용하는 언골분화용 배양액 및 골분화배양액의 조성은 표 1과 표 2에 각각 나타나 있다.

[표 1]

구성성분		농도
TGF- β III		10 ng/M ℓ
ITS- Plus	소 인슐린(bovine insulin)	6.25 μ g/M ℓ
	트랜스페린(transferrin)	6.25 μ g/M ℓ
	셀레노스산(selenous acid)	5.35 μ g/M ℓ
	리놀레익산(linoleic acid)	1.25 μ g/M ℓ
	BSA(bovine serum albumin)	100 μ g/M ℓ
소듐 피루베이트(sodium pyruvate)		100 nM
덱사메타손(dexamethasone)		100 nM
아인산 아스코르비산(ascorbic acid 2- phosphate)		50 μ g/M ℓ
프롤린(proline)		40 μ g/M ℓ

[표 2]

구성성분	농도
덱사메타손(dexamethasone)	0.1 μ M
베타 글리세롤 포스페이트(β - glycerol phosphate)	10 mM
아인산 아스코르비산(ascorbic acid 2- phosphate)	50 μ M

상기 표 1 및 표 2에 기재된 성분들은 DMEM, α - MEM, McCoys 5A 배지, Eagle's basal 배지, CMRL 배지, Glasgow 최소 필수 배지, Ham's F- 12 배지, Iscove's modified Dulbecco's 배지, Liebovitz' L- 15 배지, RPMI 1640 배지 등 일반적으로 사용되는 세포배양용 배지 중 선택된 하나에 침가하여 사용하며, 언골분화용 배양액의 경우 DMEM을, 골분화용 배양액의 경우 α - MEM을 사용하는 것이 바람직하다.

또한 본 발명에서 사용하는 세포분화용 배지는 상기 성분 이외에도 필요에 따라 한 가지 이상의 보조성분을 추가로 함유할 수 있다. 그 예로, 성장인자(growth factor), 말 또는 사람 등의 혈청을 비롯하여 미생물의 오염을 막기 위해 페니실린 G(penicillin G), 스트렙토마이신 살파이트(streptomycin sulfate), 암포테리신 B(ampotericin B), 젠타마이신(gentamycin), 또는 니스티틴(nystatin) 등의 항생제 및 항진균제(antifungal agent) 등을 추가할 수 있다.

실시예에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 세포 분리배양방법을 통해 제대혈로부터 높은 순도와 우수한 생존도를 지닌 간엽줄기세포 · 전구세포를 얻을 수 있다.

본 발명의 간엽줄기세포 · 전구세포는 다양한 간엽조직으로 분화할 수 있는 능력을 지니고 있어서, 적절한 배지 및 조건 하에서 언골세포의 전형적인 마커인 타입 II 콜라겐, 타입 X 콜라겐 및 아그레кан(aggrecan) 유전자를 발현한다.

또한, 본 발명의 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포는 적절한 배지 및 조건 하에서 골모세포의 전형적인 마커인 오스테오칼cin(osteocalcin), 오스테오팝틴 (osteopontin), 알칼린 포스파타이제(alkaline phosphatase) 유전자를 발현 하며, 골모세포와 마찬가지로 세포 외부에 칼슘을 축적할 수 있다.

따라서, 본 발명의 세포 분리배양방법은 소위 만능세포인 간업줄기세포 · 전구세포의 대량생산에 사용될 수 있으며, 이는 현재 제대혈 보관은행에 의해 활발히 진행중인 제대혈 보관 시스템의 확장과 맞물려 더욱 그 실용성을 발휘하게 될 것이다.

또한 본 발명의 세포 분리배양방법에 의해 얻은 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포는 필요에 따라 다양한 간업조직세포로 분화될 수 있으므로, 재생이 어려웠던 손상된 간업조직의 치료에 있어 획기적인 발전을 가져올 수 있다.

이하 실시예를 통해 본 발명을 구체적으로 설명하되, 하기 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 본 발명에 의한 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포의 분리

1) 제대혈 유래 간업줄기세포 · 전구세포의 분리 및 체외 배양

제대혈은 아기나 분만되고 난 후, 제대점액으로부터 차취하여 얻었다. 제대 혈을 차취할 때는, 제대를 알코올과 베타딘으로 잘 소독한 후, CPDA-1 항응고제가 23Ml 들어있는 제대혈 차취액에 연결된 16G 주사침을 제대점액에 찔러, 제대혈이 중력에 의해 차취액에 차취되도록 하였다(도 1).

50Ml 코니칼 블록(conical tube)에 피콜- 하이պ레((Ficoll- Hypaque, 밀도는 1.077g/Ml) 15Ml을 분주한 후, 상기에서 차취한 제대혈 25Ml을 피콜- 하이პ에 첨가한 후 첨시시키고, 400 × g의 속도로 실온에서 40분 동안 원심분리하여 단핵세포층(mononuclear cells layer)으로 이루어진 침전을 얻었다. 상층액을 제거한 후 단핵세포층을 새로운 투브로 옮기고, 2% FBS(fetal bovine serum)을 함유하는 PBS(phosphate buffered saline) 30Ml을 첨가한 후 200 × g의 속도에서 10분 동안 원심분리하여 세척하였다.

상기 세척과정을 2회 실시한 후, 단핵세포층에 NH₄Cl-Tris 용액 30Ml을 첨가하여 15분간 방치한 후, 200 × g의 속도로 실온에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고, 2% FBS-PBS 30Ml을 첨가하여 200 × g의 속도로 실온에서 10분간 원심분리하여 세척하였다.

상기 과정을 다시 반복한 후, 상층액을 제거하여 얻은 단핵세포층에 10% 우태혈청을 함유한 기본배지(a- MEM 배지 혹은 DMEM 배지) 10Ml을 첨가한 후 충분히 혼합하였다.

상기와 같이 분리한 단핵세포의 생존도와 세포수를 측정한 후, 세포배양용기에 기본배지와 적정수(5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶ 세포/㎡)의 분리된 세포를 넣은 후, 5% 이산화탄소가 공급되는 세포배양기(37°C에서 단층배양(monolayer culture)하였다.

매일 현미경을 이용해 콜로니를 관찰하여 콜로니가 배양용기 바닥에 단층을 이루며 잘 부착되어(well- attached) 자라는지를 확인하였다.

세포들이 90% 교회(confluent)하여 자라면, 흡입장치(suction pump)와 패펫을 사용하여 배지를 제거한 후, 칼슘 및 마그네슘이 제거된 PBS로 세포들을 세척하였다. 세척된 세포에 0.25% 트립신/EDTA 용액을 첨가한 후, 5% 이산화탄소가 공급되는 37°C 세포배양기에서 10분간 방치하였다. 세포배양용기로부터 떨어져 나온 세포들을 다시 투브에 모은 후, 200 × g의 속도로 실온에서 10분간 원심분리하여 세척하였다.

세척된 세포를 간업줄기/전구세포 득이 항원에 대한 항체와 일정시간 반응시켰다. 이때 사용된 간업줄기/전구세포 득이 항원에 대한 항체는 CD105, stro-1, SH3 및 SH4에 대한 항체로, 각 항체는 마그네틱 미세비드(magnetic microbead), 또는 FITC(fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin), PerCP 등의 형광물질이 부착되어 있다.

항체와 반응시킨 후, 마그네틱 세포 분리기(magnetic cell sorter) 또는 FACSsorter 등의 세포분리장비를 이용하여, 해당 항체와 결합한 간업줄기세포 · 전구세포를 분리하였다.

상기와 같이 분리한 세포에 10% FBS를 포함한 기본배지 10Ml을 첨가하여 충분히 혼합한 후, 생존도와 세포수를 측정하였다. 세포배양용기에 기본배지와 적정 수(4~5 × 10⁴ 세포/㎡)의 간업줄기세포 · 전구세포를 넣어, 5% 이산화탄소가 공급되는 37°C 세포배양기에서 배양하였다.

이후 세포들이 100% 교화할 때마다 계대배양(subcultivation)을 반복시행하여, 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 수를 체외 증폭(*ex vivo* expansion)시켰다.

본 발명의 방법에 의해 분리된 세포의 형태학적 특징은 도 2에 나타나 있다. 도 2a에서, 본 발명의 방법에 의해 분리된 세포는 간엽줄기세포·전구세포의 전형적 형태인 방주 형태(spindle shape) 및 균일한(homogeneous) 섬유세포양(fibroblast-like) 폴로니의 형태를 띠며 자랐다. 도 2b와 같이, 본 발명의 세포를 트리판 블루(trypan blue)로 염색하여 생존도를 확인한 결과, 생존도 또한 98~99%로 매우 우수하였다.

따라서, 본 발명의 방법은 제대혈로부터 간엽줄기세포·전구세포를 효율적으로 분리배양할 수 있다.

2) 본 발명의 방법으로 얻은 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 특성 분석

본 발명의 방법으로 얻은 제대혈 유래 세포가 간엽줄기세포·전구세포의 특성을 지니고 있는지 확인하기 위해, 상기 실시예 1의 1)에서 얻은 세포들 세포표면 항원의 발현 양상을 다음과 같이 조사하였다.

본 실시예에서 얻은 세포들은 제대혈 유래 세포로 확인되었으며, 제대혈 유래 세포는 조혈관련항원인 CD45, CD34, CD14, 조직적합항원인 HLA-DR, 내피세포 관련항원인 CD31, 파골세포 관련항원인 CD51/61, 인테그린 수용체 관련항원인 CD29, CD49d, CD49e, 매트릭스 수용체 관련항원인 CD44, CD54, CD106, 간엽줄기세포·전구세포 특이적 항원인 SH2, SH3, SH4 및 기타 항원인 CD13, CD64, CD90이었다.

상기 1)에서 배양한 세포를 2×10^6 개가 되도록 준비하여 2% FBS를 함유하는 PBS 용액으로 세척하고, 각 항원에 해당하는 항체와 실온에서 반응시켰다. 항원의 발현 여부는 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였으며, 조혈관련항원 및 조직적합항원에 대한 결과는 도 3에, 내피세포 관련항원 및 파골세포 관련항원에 대한 결과는 도 4에, 인테그린 수용체 관련항원에 대한 결과는 도 5에, 매트릭스 수용체 관련항원에 대한 결과는 도 6에, 기타 항원에 대한 결과는 도 7에 나타나 있다.

도 3에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 조혈관련항원인 CD45, CD34, CD14, 그리고 조직적합항원인 HLA-DR에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타내었다.

이처럼 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 조혈관련항원과 조직적합항원이 걸어되어 있으므로, 조직이식시 문제점인 거부반응을 최소화 할 수 있다.

도 4에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 내피세포 관련항원인 CD31, 그리고 파골세포 관련항원인 CD51/61에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타내었다.

따라서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포를 조직 이식에 사용할 경우, 불필요하게 혈관을 생성하거나, 또는 언골이나 골 생성과정 중 파골세포로 분화함으로써 야기될 수 있는 부작용이 없을 것임을 알 수 있다.

도 5에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 인테그린 수용체 관련항원인 CD29 및 CD49e에 대한 항체에 대해 양성 반응을, CD49d에 대한 항체에 대해서는 음성 반응을 나타내었다.

도 6에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 매트릭스 수용체 관련항원인 CD44, CD54에 대한 항체에 대해 양성 반응을, CD106에 대한 항체에 대해서는 음성 반응을 나타내었다.

도 7에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 기타 항원들, 즉 CD13, CD90에 대한 항체에 대해 양성 반응을, 그리고 CD64에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타내었다.

또한 도 8에서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 계대배양 1 세대(passage), 5 세대, 10 세대 및 15 세대에서 각각 간엽줄기세포·전구세포의 대표적 표면항원인 SH2, SH3, SH4의 발현 여부를 조사한 결과, 여러 번의 계대배양 후에도 골수 유래 간엽줄기세포·전구세포 1 세대와 마찬가지로 이를 항원에 대해 양성 표현을 나타내고 있었으며, 여러 세대가 지난 후에도 이러한 면역표현형은 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었다.

상기 도 3에서 도 8까지 확인된 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 면역표현형은 기존의 간엽줄기세포·전구세포와 일치하는 것이다. 본 발명의 방법에 의해 제대혈로부터 분리한 세포는 간엽줄기세포·전구세포로서의 특성을 충분히 갖추고 있음을 알 수 있다.

[실시예 2] 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포로부터 얻은 세포의 분화

1) 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포로부터 언골조직의 분화

본 발명의 간엽줄기세포·전구세포가 간엽조직 세포로 분화하는 특성을 지니는지 확인하기 위해, 언골세포로의 분화를 유도하였다.

언골세포분화에 사용된 배양액은 표 1과 같은 조성을 지니며, 펠렛배양(pellet culture)을 수행하여 분화를 유도하였다. 배양액은 3일마다 교체해 주었으며, 분화유도배양 후 1주 간격으로 세포를 샘플링하여 면역표지자 발현 분석 및 분자생물학적 분석을 수행하였다.

2) 분화유도배양 언골조직의 면역학적 분석

언골분화 유도배양 후, 언골조직의 특이항원인 타입 II 콜라겐(type II collagen)의 발현 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 면역염색(immunostaining)을 시행하였다.

언골분화 후 각 시기마다 채취한 세포펠렛샘플을 파라핀에 포매시키거나 혹은 애피토프(epitope)의 항원성을 잘 유지시키기 위해서 동결박절(frozen section)하여 대략 3~5 μm 두께로 펠렛조직을 슬라이드에 고정시킨 후, 면역 염색을 시행하였다.

각 슬라이드를 파산화수소로 5분 동안 처리하여 세포 내부에 이미 존재하는 퍼옥시다제(peroxidase)를 제거하고, 단백질 블로킹(blocking) 시약으로 5분 처리하였다.

이어서 1차 항체(primary antibody)인 쥐의 모노크로날 항체와 10분간 인큐베이션하였다. 세척과정 후 스트렙타비니 퍼옥시다제(streptavidin peroxidase)를 사용하여 10분간 처리하였다. 이후 발색 기질인 크로모겐(chromogen)을 처리하여 발색반응이 일어나도록 하고, 대조염색으로서 헥마톡실린 염색(hematoxylin)을 실시하였다.

그 결과, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포를 언골로 분화유도한 후 1주째부터 펠렛의 일부에서 양성 소견이 관찰되었으며, 도 9에 나타난 바와 같이 분화유도 3주째에 이르면 펠렛 전체적으로 양성 소견이 관찰되었다.

이처럼 분화된 세포가 ECM(extracellular matrix)의 중요성분인 타입 II 콜라겐을 분비하는 것으로 보아, 상기 세포는 언골 세포로서의 기능을 충분히 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

3) 분화유도배양 언골조직의 분자생물학적 분석

언골분화 유도배양 후, 언골세포 특이적 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 RT-PCR(reverse transcription - polymerase chain reaction)을 수행하였다.

언골분화 후 각 시기마다 채취한 세포펠렛에 트리졸 R(Trizol R)을 5분간 처리한 후, 클로로포름을 처리하여 15000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 취하고 이소프로판올을 첨가하여 RNA를 침전시켰다.

RT 반응은 상기에서 얻은 RNA, 올리고 d(T) 프라이머(oligo d(T) primer) 1 μl , dNTP 혼합액 1 μl 및 RNA 분해효소가 제거된 물(RNase free water)을 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후, RT 반응완충액 4 μl , DTT 2 μl , 및 RNA 분해효소 억제제 1 μl 을 첨가하여 42°C에서 2분간 반응시켰다. 이후 역전사효소를 첨가하여 42°C에서 50분간 반응시킨 후, 그 결과 얻은 cDNA를 70°C에서 15분간 불활성화시켜 PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

PCR은 타입 I 콜라겐, 타입 II 콜라겐, 타입 X 콜라겐 및 아그레간 유전자에 대해 수행하였으며, 양성대조군으로 인 간의 관절언골세포를, 그리고 음성대조군으로 세포 내에서 언제나 일정량 발현되는 GAPDH 유전자를 선택하였다.

각각의 반응 튜브에 cDNA 5 μl , 프라이머, dNTP 혼합액, 염화마그네슘, 10배 PCR 반응완충액 및 Taq 폴리머라제(polymerase)를 첨가한 후, 멀균된 3차 중류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 50 μl 로 맞춘 후 PCR을 수행하였다. 각 유전자에 대한 프라이머의 염기서열 및 반응조건은 표 3과 같다.

[표 3]

유전자	프라이머의 염기서열	PCR 반응 조성	PCR 반응 조건
	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분

GAPDH	(정방향, 서열번호 1) 5'- TCCACCAACCT GT TGCT GTA- 3' (역방향, 서열번호 2)		-> 94°C에서 30초, 60°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
	5'- CCCCCTCCCCAGCCACAAAGA- 3' (정방향, 서열번호 3)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 60°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
타입 I 콜라겐	5'- TCTTGGTCGGTGGACTCT- 3' (역방향, 서열번호 4)	cDNA 주형 5μl 프라이머 각 2.5μl PCR 혼합액 7.7μl	최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 55°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
	5'- TTTCCCAGGTCAAAGATGGTC- 3' (정방향, 서열번호 5)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 57°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
타입 II 콜라겐	5'- CTTCACCACCTGTCTCACCA- 3' (역방향, 서열번호 6)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 57°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
	5'- CCCTTTTGTGCTAGTATCC- 3' (정방향, 서열번호 7)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 60°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
타입 X 콜라겐	5'- CTGTTGTCAGGTTTCCTGGCAC- 3' (역방향, 서열번호 8)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 60°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
	5'- TGAGGAGGGCTGGAACAAATACC- 3' (정방향, 서열번호 9)		최초 변성화 반응: 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초 60°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응: 72°C에서 7분
아그레кан	5'- GGAGGTGGATTGCAGGGAAACA- 3' (역방향, 서열번호 10)		

각각의 PCR 생성물을 전기영동하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.

도 10에 나타난 바와 같이, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 연골분화유도 후 1주째부터 타입 II 콜라겐, 타입 X 콜라겐 및 아그레칸 유전자를 모두 발현하였다.

특히 분화유도시간이 경과함에 따라 각 유전자의 발현 강도는 더욱 증가하였으며, 분화유도 4주 경과 후 각 유전자의 발현량은 양성대조군인 인간의 관절연골세포('chon'으로 표시)와 비슷한 정도의 높은 수준이었다.

반면 대조군인 GAPDH 유전자의 발현량은 분화유도시간의 경과에 상관없이 일정하였다.

따라서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 적절한 조건 하에서 연골세포로 분화될 수 있다.

[실시예 3] 본 발명에 의한 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포로부터 골모세포의 분화

1) 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포로부터 골조직의 분화

본 발명의 간엽줄기세포·전구세포가 간엽조직 세포로 분화하는 특성을 지니는지 확인하기 위해, 골세포로의 분화를 유도하였다.

골세포분화에 사용된 배양액은 표 1과 같은 조성을 지니며, 단층배양을 수행하여 분화를 유도하였다. 배양액은 3일마다 교체해 주었으며, 분화유도배양 후 1주 간격으로 세포를 샘플링하여 면역표지자 발현 분석 및 분자성을 학적 분석을 수행하였다.

2) 분화유도배양 골조직의 조직화학적 분석

골분화 유도배양 후, 골조직의 특이형원인 알칼린 포스파타제의 발현 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 조직화학 염색을 시행하였다.

골분화 후 각 시기마다 단층배양을 통해 골분화유도시킨 골조직을 폐탄으로 고정시킨 후, 골모세포(osteoblast) 특이형원인 알칼린 포스파타아제에 대한 조직화학염색을 시행하였으며, 골조직의 중요한 세포와 성분인 칼슘이 측적된 것을 알아보기 위해 폰 코사(von Kossa) 염색을 시행하고 그 결과를 도 11에 나타내었다.

그 결과, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포를 글로 분화유도한 후 1주째부터 조직의 일부에서 양성 소견이 관찰되었으며, 분화유도 3~4주째에 이르면 조직의 전체에 걸쳐 양성 소견이 관찰되었다.

또한 폰 코사 염색 결과, 3~4주로 갈수록 세포외 칼슘 측적량이 증가함을 확인할 수 있었다.

이처럼 분화된 세포가 골모세포의 중요성분인 알칼린 포스파타아제를 발현하고, 세포 외부로 칼슘을 측적할 수 있는 것으로 보아, 상기 세포는 골모세포로서의 기능을 충분히 수행할 수 있을 것으로 생각된다.

3) 분화유도내양 골조직의 본자생물학적 분석

골분화 유도배양 후, 골조직 특이적 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 다음과 같이 RT-PCR을 수행하였다.

골분화 후 각 시기마다 채취한 세포조직에 트리플 R을 5분간 처리한 후, 글로로프롬을 처리하여 15000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 취하고 이소프로판을 첨가하여 RNA를 침전시켰다.

RT 반응은 상기에서 얻은 RNA, 음리고 d(T) 프라이머 1 μl, dNTP 혼합액 1 μl 및 RNA 분해효소가 제거된 물을 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후, RT 반응완충액 4 μl, DTT 2 μl, 및 RNA 분해효소 억제제 1 μl을 첨가하여 42°C에서 2분간 반응시켰다. 이후 억진사효소를 첨가하여 42°C에서 50분간 반응시킨 후, 그 결과 얻은 cDNA를 70°C에서 15분간 블可想화시켜 PCR의 주형으로 사용하였다.

PCR은 골 특이적 유전자인 오스테오칼신, 오스테오피틴, 알칼린 포스파타아제에 대해 수행하였으며, 음성대조군은 세포 내에서 언제나 일정량 발현되는 GAPDH 유전자를 선택하였다.

각각의 반응 튜브에 cDNA 5 μl, 프라이머, dNTP 혼합액, 염화마그네슘, 10배 PCR 반응완충액 및 Taq 폴리머라제(polymerase)를 첨가한 후, 멀균된 3차 중류수를 첨가하여 최종 반응 부피를 50 μl로 맞춘 후 PCR을 수행하였다. 각 유전자에 대한 프라이머의 염기서열 및 반응조건은 표 4과 같다.

[표 4]

유전자	프라이머의 염기서열	PCR 반응 조성	PCR 반응 조건
GAPDH	5'- ACCACAGTCCATGCCATCAC- 3' (정방향, 서열번호 1) 5'- TCCACCAACCT GTT GCT GTA- 3' (역방향, 서열번호 2)		
오스테오칼신	5'- CAT GACAGCCCT CACA- 3' (정방향, 서열번호 11) 5'- AGAGCGACACCTAGAC- 3' (정방향, 서열번호 12)		최초 변성화 반응 94°C에서 2분 -> 94°C에서 30초
오스테오피틴	5'- CCAAGTAAAGTCCAACGAAAG- 3' (정방향, 서열번호 13) 5'- GGT GAT GT CCT CGT CT GTA- 3' (정방향, 서열번호 14)	cDNA 주형 5 μl 프라이머 각 2.5 μl PCR 혼합액 7.7 μl	55°C에서 30초 72°C에서 30초 (35회 반복) -> 최종 연장 반응 72°C에서 7분
알칼린 포스파타아제	5'- TGGAGCTTCAGAGACTCAACACCA- 3' (정방향, 서열번호 15) 5'- ATCTCGTTGTCTGAGTACCACTCC- 3' (정방향, 서열번호 16)		

각각의 PCR 생성물을 전기영동하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.

도 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 연골분화유도 후 1주째부터 오스테오칼신, 오스테오린, 알칼린 포스파타아제를 모두 발현하였으며, 분화유도시간이 경과함에 따라 각 유전자의 발현 강도는 더욱 증가하였다.

반면 대조군인 GAPDH 유전자의 발현량은 분화유도시간의 경과에 상관없이 일정하였다.

따라서, 본 발명의 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 적절한 조건 하에서 골세포로 분화될 수 있다.

발명의 효과

본 발명의 세포 분리배양방법은 제대혈로부터 간엽줄기세포·전구세포를 높은 생존도와 순도를 유지하면서 분리하는데는 효과가 있다.

본 발명에 의해 분리배양된 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 적절한 조건 하에서 완전한 연골세포 및 골세포 등의 간엽조직으로 분화될 수 있다.

따라서, 본 발명의 세포 분리배양방법 및 그에 의해 분리배양된 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포는 손상된 간엽조직의 재생 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

제대혈을 피클·하이팩 용액에 중첩시킨 후, 원심분리하여 단핵세포층 침전을 얹고, 상기 단핵세포를 단층배양하여 얻은 세포들을 간엽줄기세포·전구세포 특이 항원에 대한 항체와 일정시간 반응시키고, 세포분리기를 이용하여 해당 항체와 결합한 세포들을만 분리하여 배양함을 특징으로 하는 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 분리배양방법

청구항 2.

제 1항에 있어서, 간엽줄기세포·전구세포 특이 항원에 대한 항체는 CD105, stro-1, SH3 및 SH4에 대한 항체 중 선택된 하나 이상을 사용함을 특징으로 하는 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포의 분리배양방법

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항의 방법을 이용하여 분리배양된 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포

청구항 4.

제 3항에 있어서, CD29, CD49e, CD44, CD54, CD13, CD90, SH2, SH3, SH4에 대한 항체에 대해 양성 반응을 나타내며, CD45, CD34, CD14, HLA-DR, CD31, CD51/61, CD49d, CD106, CD64에 대한 항체에 대해 음성 반응을 나타내며, 특징으로 하는 제대혈 유래 간엽줄기세포·전구세포

청구항 5.

제 4항의 세포를 세포분화용 배지에서 일정시간 배양함을 특징으로 하는 간엽조직세포로의 분화방법

청구항 6.

제 5항에 있어서, 간엽조직세포는 연골세포임을 특징으로 하는 간엽조직세포로의 분화방법

청구항 7.

제 6항에 있어서, 세포분화용 배지는 TGF- β III 10 ng/mL, 소 인슐린(bovine insulin) 6.25 μ g/mL, 트랜스페린(transferrin) 6.25 μ g/mL, 셀레노스산(selenous acid) 5.35 μ g/mL, 리놀레익산(linoleic acid) 1.25 μ g/mL, BSA(bovine serum albumin) 100 μ g/mL, 소듐 피루비레이트(sodium pyruvate) 100 nM, 데사메타손(dexamethasone) 100 nM, 이인산(ascorbic acid 2-phosphate) 50 μ g/mL, 프롤린(proline) 40 μ g/mL으로 이루어짐을 특징으로 하는 간엽조직세포로의 분화방법

청구항 8.

제 7항의 방법에 의해 얻어진 언골세포

청구항 9.

제 5항에 있어서, 간엽조직세포는 골세포임을 특징으로 하는 간엽조직세포로의 분화방법

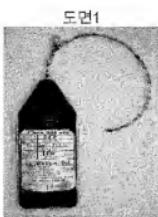
청구항 10.

제 6항에 있어서, 세포분화용 배지는 엑사메타손(dexamethasone) 0.1 μ M, 베타-글리세롤 포스페이트(β -glycerol phosphate) 10 mM, 이인산 아스코르빅산(ascorbic acid 2-phosphate) 50 μ M으로 이루어짐을 특징으로 하는 간엽조직세포로의 분화방법

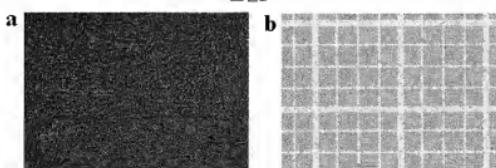
청구항 11.

제 10항의 방법에 의해 얻어진 골세포

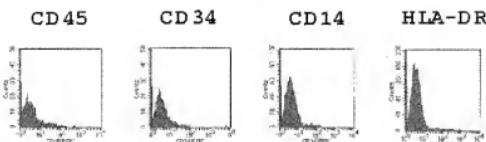
도면



도면2

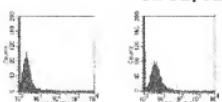


도면3



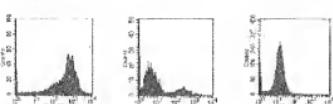
도면4

CD 31 CD 51/61



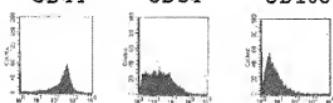
도면5

CD 29 CD 49d CD 49e



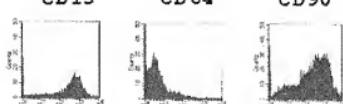
도면6

CD 44 CD 54 CD 106



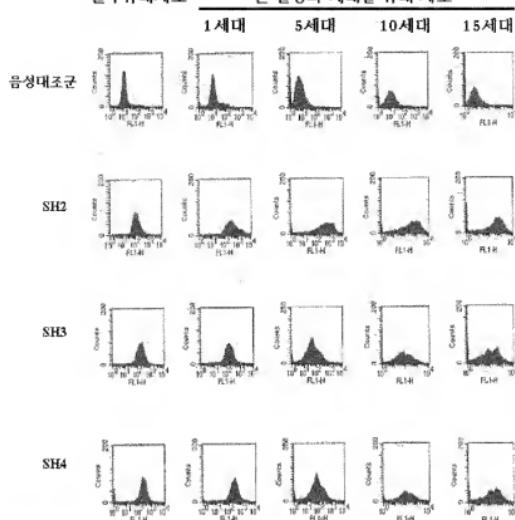
도면7

CD 13 CD 64 CD 90

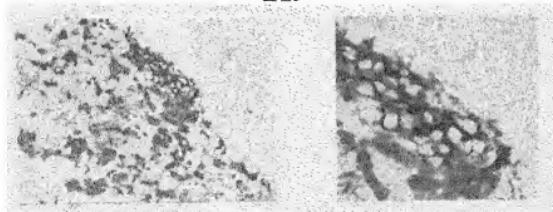


도면8

본 발명의 계대형 유래 세포



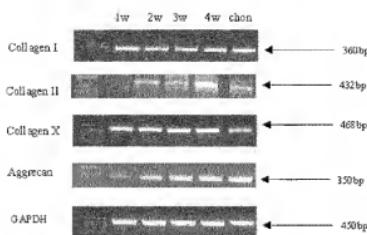
도면9



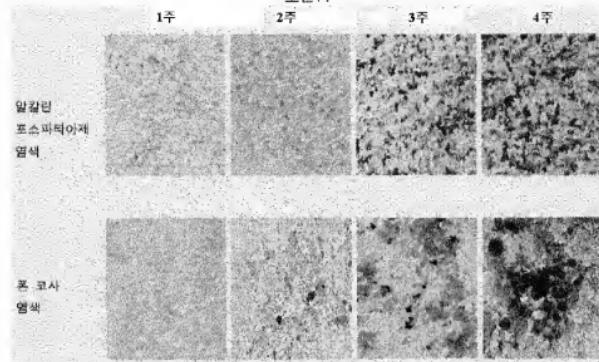
x 200

x 400

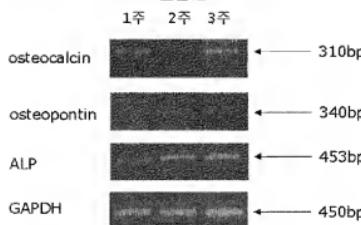
도면10



도면11



도면12



<110> Medi post

HA Chul won

<120> Isolation and culture-expansion methods of mesenchymal stem progenitor cells from umbilical cord blood, and

differentiation method of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem/progenitor cells into various mesenchymal tissues

<130> 03P-30
 <160> 16
 <170> Kopatent In. 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for amplifying GAPDH gene
 <400> 1
 accacagtcc at gccat cac 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer for amplifying GAPDH gene
 <400> 2
 tccaccaccc t gtt gct gta 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for amplifying type 1 collagen gene
 <400> 3
 cccctcccc agccacaaag a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying type 1 collagen gene

<400> 4

t c t t g g t c g g t g g t g g a c t c t

21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying type 2 collagen gene

<400> 5

t t t c c c a g g t c a a g a g g t c

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying type 2 collagen gene

<400> 6

c t t a c c a c c t g t c t c a c c a

20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying type 10 collagen gene

<400> 7

c c c t t t t g c t g t a g t a t c c

21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying type 10 collagen gene

<400>	8	
ctgtgtccaggtttctggcac		24
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for amplifying aggrecan gene	
<400>	9	
tgggggggc tggaaacgt acc		23
<210>	10	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for amplifying aggrecan gene	
<400>	10	
ggaggtggta at tgcaggga aca		23
<210>	11	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for amplifying osteocalcin gene	
<400>	11	
catgacagcc ct caca		16
<210>	12	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for amplifying osteocalcin gene	
<400>	12	
agagcgacac cct agac		17

<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for amplifying osteopontin gene	
<400>	13	
ccaaagtaaagt ccaacgaaag		20
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for amplifying osteopontin gene	
<400>	14	
ggtagtgcctcgctgt a		19
<210>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	forward primer for amplifying alkaline phosphatase gene	
<400>	15	
tggagcttca gagactcaac acca		24
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	reverse primer for amplifying alkaline phosphatase gene	
<400>	16	
atctcglttgt ctgagtaccatgtcc		24